

7

J. L. CANOVAS, M. RUIZ-AMIL y M. LOSADA

CITRAMALATOSINTASA
EN *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS*



MADRID

1 9 6 4

CITRAMALATOSINTASA EN *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* (*)

por

J. L. CANOVAS, M. RUIZ-AMIL y M. LOSADA

La citramalatosintasa, enzima que cataliza la condensación de acetilcoenzima A ($\text{Ac}-\text{CoA}$) y piruvato a citramalato, fue estudiada primeramente en la bacteria fotosintética *Chromatium* (1, 13) y más tarde en diferentes bacterias (3, 8, 15-16), hojas de *Bryophyllum* (4) y levadura de panadería (12).

Varios autores (1, 5, 11, 13) han sugerido que la reacción condensante catalizada por esta enzima podría ser la etapa inicial para la formación de ácido glutámico, a través de un proceso asimilatorio independiente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y similar a la ruta degradativa de glutamato encontrada por Barker (2) en *Clostridium tetanomorphum*. En la vía de Barker, el citramalato es desdoblado en acetato y piruvato por la acción de la citramalasa en una reacción que no requiere CoA.

El presente trabajo revela la presencia de citramalatosintasa en la bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas palustris*.

MATERIAL Y METODOS

Una cepa de *Rhodopseudomonas palustris* procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (11168), fue crecida en la luz utilizando un banco de lámparas de wolframio, a una temperatura aproximada

(*) El presente trabajo ha sido realizado con Ayudas del Instituto Nacional de Sanidad de los Estados Unidos (AM 06848-01) y de la Fundación «Juan March».

de 30 °C, en frascos de vidrio con tapón esmerilado, completamente llenos de medio de cultivo, para excluir el aire. El sobrecalentamiento de los cultivos por la radiación térmica de las lámparas fue evitado mediante un sistema de aireación con turbinas de aire. Como solución nutritiva se utilizó el medio de malato descrito por Hoare (9), incubándolo con inóculos aproximadamente del 3 por ciento. La cepa fue conservada por siembra en picadura en el medio indicado, solidificado con ágar al 2 por ciento.

Las células fueron cosechadas al cabo de treinta y seis horas de incubación por centrifugación a 8.000 g durante cinco minutos, y se lavaron con solución 0,05 M de fosfato potásico, pH 7,3. El rendimiento medio obtenido fue de 4-5 g (peso húmedo) de células/l de cultivo. La preparación de los extractos se llevó a cabo triturando en mortero las células con alúmina y extrayendo a continuación con fosfato potásico 0,05 M, pH 7,3. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 30.000 g durante veinte minutos, fue entonces dializado durante veinte horas contra el tampón de fosfato indicado. Todas las operaciones se realizaron a 0°-4 °C. El contenido en proteína de los extractos se determinó espectrofotométricamente, según el método de Warburg y Christian (18).

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 30 °C y fueron detenidas al tiempo deseado por adición de ClH hasta una concentración final de 0,6 N. Después de separar por centrifugación la proteína precipitada, se analizaron los productos formados a partir de los diferentes compuestos radiactivos empleados, por cromatografía bidimensional (en papel Whatman núm. 41) y radioautografía. Como disolventes se utilizaron una mezcla de n-butanol + ácido acético glacial + agua (52 : 14 : 34, v/v), y otra de fenol + agua (80 : 20, p/v). Los compuestos radiactivos aislados en los cromatogramas se identificaron por cocromatografía con muestras de los compuestos auténticos y sus cantidades se calcularon midiendo su radiactividad sobre el papel seco.

El origen de los productos empleados fue el siguiente: el ácido DL-citramálico fue amablemente suministrado por el Prof. A. V. Trebst y la alúmina (A-305) por «Alcoa». El coenzima A (CoA), adenosintrifosfato (ATP) y piruvato fueron proporcionados por la «Sigma Chemical Company»; el acetato ¹⁴C-2 y el piruvato ¹⁴C-1, por el «Radiochemical Centre», de Amersham. El Ac-CoA se preparó según el método descrito por Stadtman (17).

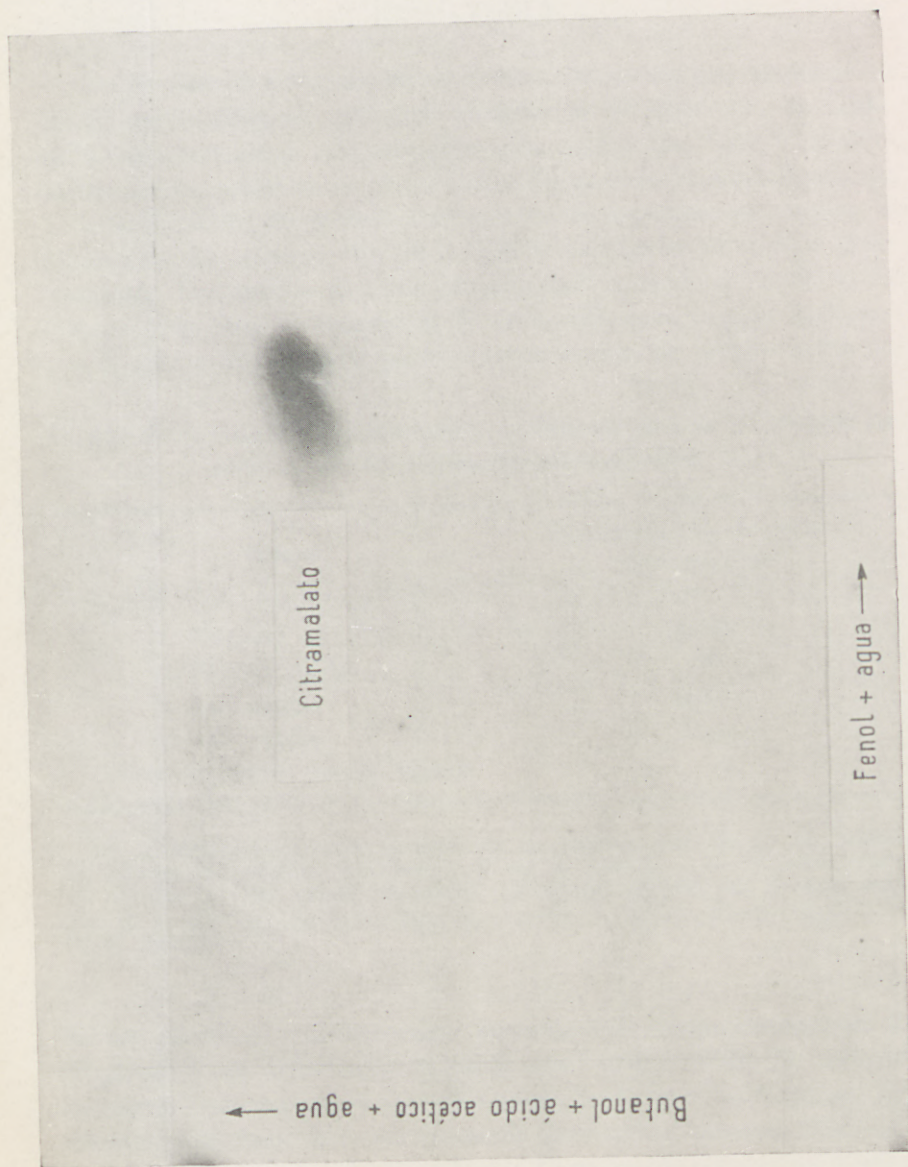


Figura 1. Radioautografía de un cromatograma mostrando los productos de la fijación de acetato ^{14}C -2 por extractos libres de células de *Rhodospseudomonas palustris*. Condiciones experimentales: como en el tratamiento 1 del cuadro 1

RESULTADOS

Los resultados recogidos en el *cuadro 1* muestran que los extractos de *Rhodopseudomonas palustris* catalizan la incorporación de acetato ^{14}C en presencia de piruvato, formando citramalato. Cuando se utilizaron extractos inactivados por el calor, desapareció la radiactividad en la zona del ácido citramálico, demostrando la naturaleza enzimática de la reacción. En ausencia de CoA y ATP, la reacción no tuvo lugar, prácticamente. Los indicios de citramalato formado cuando se omitió en los sistemas reaccionantes la adición de estos cofactores pueden explicarse por el aporte mínimo que de los mismos hacen los propios extractos.

Cuadro 1. Formación de citramalato a partir de acetato y piruvato por extractos de Rhodopseudomonas palustris ()*

Sistema	Radiactividad en citramalato, impulsos/minuto
1. Completo	23.500
2. Piruvato omitido	200
3. CoA omitido	2.000
4. ATP omitido	2.000
5. Completo, extracto hervido	0

(*) La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1,0 ml, extracto dializado de *Rh. palustris* equivalente a 10 mg de proteína, y en micromoles: tampón tris, pH 7,6, 100; cloruro magnésico, 10; cloruro amónico, 20; glutatión reducido, 10; acetato ^{14}C -2 (4 μc), 2; CoA, 0,2; piruvato, 5; ATP, 5. Tiempo de reacción, treinta minutos.

Se ha calculado una actividad específica de citramalatosintasa de 50 $\mu\text{mol/h}$ y mg de proteína en los extractos dializados de *Rh. palustris*. La *figura 1* corresponde a la radioautografía de un cromatograma, que muestra el producto de la condensación de acetato y piruvato ^{14}C -2 catalizada por los extractos de *Rh. palustris*. Como puede observarse, el único compuesto radiactivado formado en cantidades significativas fue el ácido citramálico.

Tal como ocurre en otros microorganismos, el *Rhodopseudomonas palustris* lleva a cabo la síntesis de citramalato por una condensación directa de $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ y piruvato. Esto se demostró incubando los extractos con $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ no radiactivo y piruvato ^{14}C -1. Las condiciones experimentales y los resultados obtenidos aparecen en el cuadro 2. En la prueba testigo, en la que se suprimió la adición de $\text{Ac} \sim \text{CoA}$, la radiactividad incorporada en citramalato fue despreciable.

Cuadro 2. Condensación de $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ y piruvato por extractos de *Rhodopseudomonas palustris* (*)

Sistema	Radiactividad en citramalato, impulsos/minuto
1. Completo	21.500
2. $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ omitido	2.600

(*) Condiciones experimentales del sistema completo, como en el tratamiento 1 del cuadro 1, excepto que se omitió la adición de acetato ^{14}C -2, CoA , ATP y piruvato, y se añadieron $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ y piruvato ^{14}C -1 (5 μc), 2 μmol de cada.

DISCUSION

La síntesis biológica de ácidos dicarboxílicos ramificados de 5 átomos de carbono tiene lugar en los microorganismos estudiados hasta ahora por medio de dos reacciones diferentes. Bentley y Thiessen (4) y Jensen y colaboradores (10) demostraron que los extractos libres de células de *Aspergillus terreus* formaban ácido itacónico por descarboxilación del ácido cis-acotínico, mientras que Losada y colaboradores (13) encontraron que, en *Chromatium*, el precursor del ácido itacónico era el ácido citramálico formado por condensación de piruvato y $\text{Ac} \sim \text{CoA}$. La interconversión de itaconato y citramalato ha sido claramente demostrada en bacterias (6, 15). Nuestros resultados indican que en *Rhodopseudomonas*, el ácido citramálico se forma por condensación de $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ y piruvato y no a través de citrato y cis-aconitato.

Según se ha indicado, diversos autores (1, 5, 11, 13) han propuesto

la existencia en organismos fotosintéticos (*Chromatium*, hojas de *Bryophyllum* y *Chlorella*) de una ruta metabólica de síntesis de ácido glutámico, cuya fase inicial sería la formación de citramalato. Por otra parte, Hoare (9) ha demostrado que durante el fotometabolismo del acetato por *Rhodospirillum rubrum*, el primer compuesto hidrosoluble formado era ácido glutámico, concluyendo que su síntesis había de tener lugar por una ruta desconocida y distinta de lo convencional a través del ciclo del ácido cítrico, sin que sus resultados excluyan, sin embargo, el esquema propuesto por Arnon y colaboradores (1, 13). Glover y colaboradores (7) encontraron que incubando en la luz células en reposo de *Rh. rubrum* con acetato ^{14}C , el producto de la fracción soluble con mayor porcentaje de radiactividad (60 por ciento en veinticuatro segundos) era el «Compuesto X», cuyos valores de Rf en distintos disolventes eran muy parecidos a los del ácido α -cetoglutámico. Parece probable que este compuesto fuese ácido citramálico, dado por un lado su comportamiento cromatográfico y por otro el que Benedict (3) identificara como citramalato uno de los primeros compuestos formados por *Rh. rubrum* a partir del acetato.

Creemos lógico que si tanto en *Chromatium* como en *Rhodospirillum rubrum*, el citramalato y el glutamato son productos primarios y mayoritarios en la asimilación del acetato, su metabolismo puede estar íntimamente ligado. No obstante, los experimentos realizados por nosotros sobre la distribución isotópica del carbono radiactivo procedente del acetato ^{14}C incorporado por extractos de la bacteria fotosintética *Rh. palustris*, no han proporcionado evidencia alguna de síntesis de glutámico a partir de citramalato. Por lo tanto, la función fisiológica de la citramalatosintasa en el microorganismo estudiado permanece por el momento desconocida.

RESUMEN

Extractos libres de células de *Rhodopseudomonas palustris* incorporan acetato ^{14}C en citramalato en presencia de piruvato, CoA y ATP.

La fijación del acetato está catalizada por la citramalatosintasa presente en los extractos, que condensa $\text{Ac} \sim \text{CoA}$ y piruvato, formando citramalato.

Se discute la posible función fisiológica de esta reacción en la síntesis de material celular.

SUMMARY

Cell free extracts of *Rhodospseudomonas palustris* catalyze the incorporation of C^{14} -acetate into citramalate in the presence of pyruvate, CoA and ATP.

The acetate fixation is catalyzed by the citramalate synthase present in the extracts which condenses $Ac \sim CoA$ and pyruvate forming citramalate.

The possible physiological function of this reaction in the synthesis of cell material is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. ARNON, D. I.; LOSADA, M.; TREBST, A. V., y OGATA, S. 1960. Federation Proc., 19, 329.
2. BARKER, H. A. *En*: I. C. GUNSALES y R. STANIER. 1961. The bacteria, 2, 151.
3. BENEDICT, C. R. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 56, 620.
4. BENTLEY, R., y THIESSEN, C. P. 1957. J. Biol. Chem., 226, 703.
5. CALVIN, M., y BASSHAM, J. A. 1962. The photosynthesis of carbon compounds, 35. W. A. Benjamin Inc., Publishers, Nueva York.
6. COOPER, R. A., y KORNBERG, H. L. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 62, 438.
7. GLOVER, J.; KAMEN, M. D., y VAN GENDEREN, H. 1952. Arch. Biochem. Biophys., 35, 384.
8. GRAY, C. T., y KORNBERG, H. L. 1960. Biochim. Biophys. Acta, 42, 371.
9. HOARE, D. S. 1963. Biochem. J., 87, 284.
10. JENSEN, E. B.; LARSEN, H., y ORMEROD, J. G. 1956. Acta Chem. Scand., 10, 1.047.
11. JOLCHINE, G. 1962. Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 337.
12. LOSADA, M.; CÁNOVAS, J. L., y RUIZ-AMIL, M. 1964. Biochem. Z. (en prensa).
13. LOSADA, M.; TREBST, A. V.; OGATA, S., y ARNON, D. I. 1960. Nature, 186, 753.
14. NAGAI, J. 1963. J. Biochem. (Tokyo), 53, 181.
15. NAGAI, J. 1963. J. Biochem. (Tokyo), 54, 34.
16. RUIZ-AMIL, M.; CÁNOVAS, J. L., y LOSADA, M. 1963. Microbiol. Españ., 2, 231.
17. STADTMAN, E. R. *En*: S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN. 1957. Methods in enzymology, 3, 931.
18. WARBURG, O., y CHRISTIAN, W. 1941. Biochem. Z., 310, 384.